

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19618

研究課題名（和文）網羅的エピゲノム解析による自閉スペクトラム症の分子機構の解明とバイオマーカー探索

研究課題名（英文）Epigenome-wide association study for revealing molecular mechanisms and biomarker identification of autism spectrum disorders

研究代表者

岸 玲子（Kishi, Reiko）

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・センター特別招へい教授

研究者番号：80112449

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では自閉スペクトラム症（ASD）発症に関与するエピゲノム変化と環境要因との関連を検討し、疾病発症メカニズムに関与する要因を解明する。北海道スタディにおいて、臍帯血中DNAのメチル化率、特に胎児発育に関与する部位（H19）に関して小児ASD傾向に関与する可能性が示唆された。ASD傾向群と健常群で5つの代謝物（5-HEPE、Leukotriene B4-1など）有意な差が認められた。本研究で臍帯血中の脂質代謝物（抗炎症、PPAR アゴニスト）と小児ASD傾向の関連が示唆した経路は、先行研究の小児ASD児末梢血の脂質異常の代謝物の経路と類似するものだった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉スペクトラム症（ASD）の症状は個人差が大きく、問診と行動観察による診断では評価者により見立てが異なり、疾患バイオマーカーなどの利用可能な客観的病態評価指標は存在しない。エピゲノム制御は遺伝子の塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現を制御する機序であり、新たなASD発症分子機構の解明や疾患バイオマーカー発見に資する可能性が高い。ASDは長期的な医療管理が必要であり、未だ抜本的な治療法や予防対策は解明されていない。また、若者のうつを含む精神疾患の増加は社会問題として大きく、根底にはASDなどの発達障害の関与が示唆されている。

研究成果の概要（英文）：Our aim in this study elucidates environmental factors and epigenomic alterations involved in the onset of autism spectrum disorder (ASD). In the Hokkaido study, we found that methylation of H19 (which is involved in fetal development) extracted from DNA in cord blood was significantly associated with the prevalence of ASD in children. Moreover, significant difference levels of five lipid metabolites (5-HEPE, Leukotriene B4-1, etc.) in cord blood were observed between the suspected ASD and controls. The pathways suggested by the association between lipid metabolites in cord blood (anti-inflammatory, PPAR agonist) and suspected ASD in this study were likely to be those of metabolites of lipid abnormalities in the peripheral blood of children with ASD in previous studies.

研究分野：公衆衛生

キーワード：エピゲノム メチル化 バイオマーカー コホート研究 自閉スペクトラム症

## 1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症 (ASD : Autism spectrum disorder) の症状は個人差が大きく、問診と行動観察による診断では評価者により見立てが異なり、疾患バイオマーカーなどの利用可能な客観的病態評価指標は存在しない。近年、胎児期の環境によりエピゲノム修飾が生じ、胎児に疾患素因が形成されることが明らかにされ始めた。これまでの遺伝子変異とは異なり、エピゲノム制御は遺伝子の塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現を制御する機序であり、新たな ASD 発症分子機構の解明や疾患バイオマーカー発見に資する可能性が高い。ASD は長期的な医療管理が必要であり、未だ抜本的な治療法や予防対策は解明されていない。また、若者のうつを含む精神疾患の増加は社会問題として大きく、根底には ASD などの発達障害の関与が示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、胎児期のエピゲノム修飾が引き起こす遺伝子発現制御による ASD 発症経路を明らかにする。加えて、生後の末梢血の潜在的疾病マーカーおよび DNA メチル化を解析することにより、ASD 症状を惹起するエピゲノム変化と胎児期および生後の環境要因との関連を検討し、疾病発症メカニズムに影響する環境要因を解明する。同定される臍帯血の DNA メチル化部位および慢性炎症やサイトカインは ASD 発症機序に基づいた新規の疾病バイオマーカーとして早期発見・診断に貢献する。

## 3. 研究の方法

北海道スタディ (札幌コーホート) に参加登録した母児 514 名 (出生期間 : 2002 年から 2005 年) を追跡して CBCL/4-18 日本語版を実施した。CBCL (Child Behavior Checklist) は子どもの情緒や行動の問題を包括的に評価する質問票である。本研究では双胎を除外した 7 歳 CBCL が得られた 124 名を対象とした。解析には総得点および 2 つの上位尺度である内向尺度、外向尺度の T 得点を用いた。パイロシークエンス法 (Qiagen 社) を用いて IGF2/H19、LINE1 遺伝子領域の臍帯血 DNA メチル化について定量を行った。妊娠中、出生時 (臍帯血中メチル化率を含む)、および小学校入学時までの変数を、重回帰分析においてステップワイズや変数増減法により、統計的有意水準 ( $p < 0.05$ ) および解析モデルの適合性を基準に 7 歳 CBCL の総得点、内向尺度、外向尺度にそれぞれ関連する変数によるモデルを作成した。CBCL 調査時の月齢と学年、およびメチル化解析実験時期は強制的にモデルに投入した。次に、7 歳 CBCL が得られたうち、臍帯血検体がある 58 名を対象に、ASD の早期バイオマーカー検索を目的として血清中のメタボロミクス解析を実施した (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社)。ASD 傾向のカットオフポイントは 3 つの下位項目「ひきこもり」「社会性の問題」「思考の問題」の T 得点の合計が 180 を超える小児を ASD 傾向のケースとして定義した (Biederman ら 2010)。

## 4. 研究成果

7 歳の CBCL 総得点の中央値は 55 であった。重回帰モデルの結果から、7 歳の CBCL の総得点、内向尺度、外向尺度のいずれかに、児の甲状腺、カフェイン、社会的経済要因 (年収)、臍帯血中メチル化率 (H19) が関連する可能性が示された。IGF2/H19 領域は IGF2 (インスリン様成長因子 2) の調整領域であり胎児発育に関与する (Pidsley ら 2012)。LINE1 領域はヒトのゲノムの 17% を占め、ゲノム全体のメチル化の指標として用いられる (Cordaux ら 2009)。本研究より臍帯血中 DNA のメチル化率、特に胎児発育に関与する部位に関して、成長後の小児 ASD 傾向に関与する可能性が示唆された (表 1)。

メタボロミクス解析対象者 58 名における ASD 傾向のケースは、CBCL の下位 3 項目の T 得点合計が 180 以上であったのは男女 2 名ずつ合計 4 名であった。ケース群のうち男児 2 名の T 得点は 210 以上、女児 2 名は 180-195 の間にあった。メタボロミクス解析は生体内には生物代謝によって生産された多様な有機化学物 (代謝物質) である低分子の糖、有機酸、アミノ酸などの代謝物質の種類や濃度を網羅的に分析、解析する手法である。本研究では臍帯血血清について LC-TOFMS (液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析計) により、HMT 代謝物質ライブラリに登録された物質の  $m/z$  及び RT の値から 345 (ポジティブ 190, ネガティブ 155) ピークに候補化合物が付与された。測定結果について、各検体で遺伝子発現量が一律に増減せず、測定条件等による系統誤差を補正するグローバル正規化が妥当であるため、本研究では中央値を揃える正規化を行った (図 1)。また 1 検体の測定結果が大きく外れていたため、この検体は解析から除外した。

統計解析は 57 検体の正規化済みのメタボロミクス値について、ASD 傾向ケース群とコントロール群の比較を実施した。2 群間比較の T 検定において多重比較補正した  $FDR < 0.05$  を有意水準とした。ケース群とコントロール群に有意な差 ( $FDR < 0.05$ ) が認められた代謝物に関して、5-HEPE (5-ヒドロキシエイコサペンタエン酸) を含む長鎖多価不飽和酸 (LCPUFA) は抗炎症、抗神経変性作用などが報告されている (Onodera ら 2017)。Leukotriene B4-1 は炎症に関与するロイコトリエンであり、肥満マウスのインスリン抵抗性を促進することが報告された (Bastihalli ら

2019)。15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin D2 は内因性 PPAR $\gamma$  アゴニストであり、抗炎症作用、インスリン感作作用、抗糖尿病作用を有し、マウスで神経炎症保護作用、認知症軽減作用が報告された (Li ら 2021)。13,14-Dihydro-15-keto-prostaglandin D2 は CRTH2/DP2 受容体に対する選択的なアゴニストであり、炎症促進作用が報告された (Diwakar ら 2019)。Flavanone は植物性食品に多く含有されるフラボノイド類の栄養素であり抗酸化作用が報告されている (Vieux ら 2020) (図 2、表 2)。ASD 児における脂質代謝異常はペルオキシソーム活性低下によるリン脂質中の DHA とプラズマローゲン濃度低下が関与する可能性が示唆されている (Wiest ら 2009)。PPAR アゴニストはペルオキシソーム活性亢進による抗炎症作用を有する ASD 治療薬として使用されている。本研究でも抗炎症、PPAR $\gamma$  アゴニストの代謝物質が抽出されたことにより、臍帯血中脂質代謝物と 7 歳の ASD 傾向の関連が示唆した経路は、先行研究における小児 ASD 児末梢血の脂質異常の経路に類似する可能性が示された。今後、臍帯血中 DNA の網羅的メチル化解析も追加し、メタボロミクスで抽出された脂質異常経路を補足する結果が得られるか検討する。

表 1 7 歳 CBCL 得点の関連要因 (重回帰分析)

	総合 T 得点	外向尺度 T 得点	内向尺度 T 得点
関連要因	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)
父 BMI (母妊娠時)	<b>1.57 (0.31, 2.83)*</b>	-0.14 (-0.76, 0.47)	0.30 (-0.36, 0.95)
新生児 TSH	<b>15.02 (0.97, 29.07)*</b>	3.49 (-3.35, 10.34)	6.66 (-0.64, 13.95) †
新生児採血日 (出生後日数)	1.04 (-6.41, 8.49)	1.48 (-2.15, 5.11)	0.99 (-2.88, 4.86)
妊婦の飲酒あり	6.57 (-3.66, 16.80)	3.32 (-1.66, 8.30)	0.23 (-5.08, 5.54)
世帯年収 500 万円以上	-4.50 (-13.75, 4.76)	<b>-6.00 (-10.50, -1.49)*</b>	-3.18 (-7.98, 1.63)
妊婦の総カフェイン摂取量	10.66 (-4.74, 26.07)	4.80 (-2.70, 12.31)	<b>9.10 (1.10, 17.10)*</b>
調査時月齢	0.71 (-1.13, 2.55)	0.34 (-0.56, 1.23)	0.31 (-0.65, 1.26)
調査時学年 (小 1 or 小 2)	-4.60 (-23.73, 14.53)	0.32 (-9.00, 9.64)	4.82 (-5.11, 14.76)
メチル化測定解析時期	14.46 (-7.37, 36.28)	-10.47 (-21.10, 0.17) †	0.55 (-10.78, 11.89)
IGF2	0.45 (-0.97, 1.86)	0.25 (-0.44, 0.94)	-0.27 (-1.00, 0.47)
H19	-0.64 (-3.06, 1.77)	-0.88 (-2.05, 0.30)	<b>-1.29 (-2.54, -0.04)*</b>
LINE1	-3.36 (-7.96, 1.23)	-0.13 (-2.37, 2.11)	-0.44 (-2.83, 1.94)

表の関連要因を一括で投入した重回帰分析モデル。対数変換して投入：新生児 TSH 値 (スクリーニング検査)、カフェイン摂取量 (FFQ より換算)。カテゴリ変数のリファレンス vs リスク要因の内容を以下に示す。妊婦の飲酒なし vs あり、世帯年収 500 万円未満 vs 500 万円以上、母の教育歴：高卒 vs 高卒以降 (専門学校卒や大学卒)、† P < 0.1、\*P < 0.05

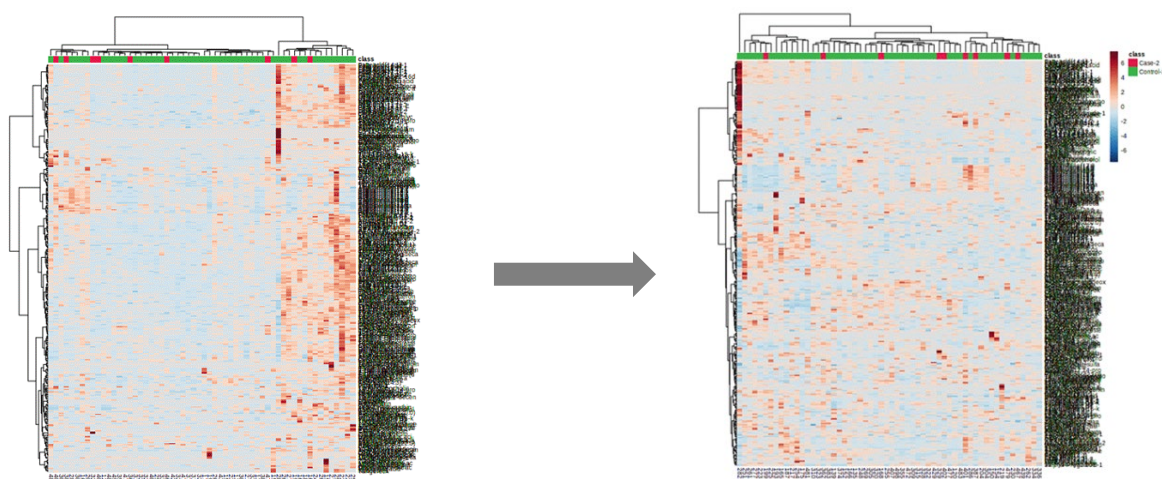


図 1. 中央値によるグローバル正規化

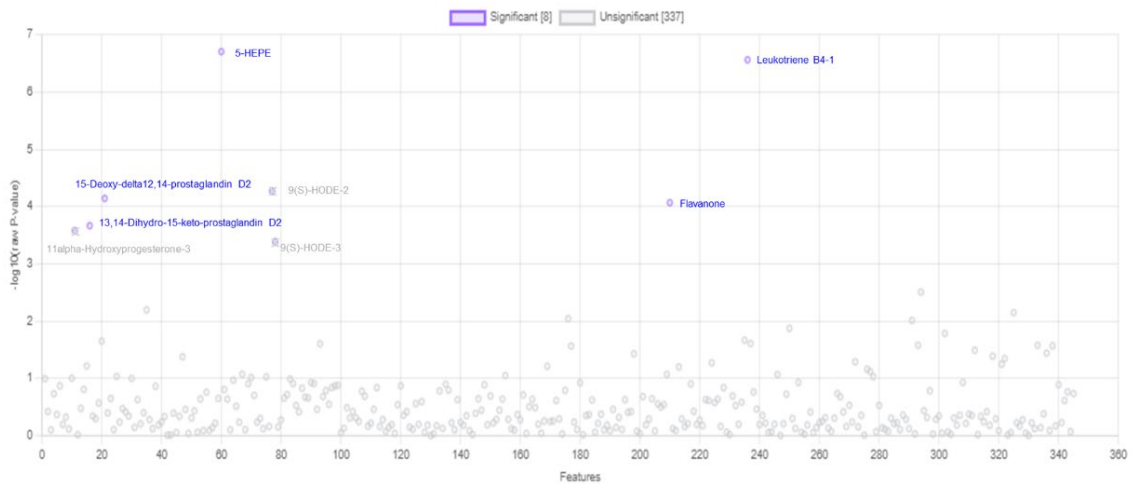


図2. T検定によりケース群とコントロール群に差がある物質 (FDR<0.05)

表2. T検定によるケースとコントロールに差がある物質

物質名	t.stat	LOG10(p)	FDR	説明
5-HEPE	5.94	6.7038	4.75E-05	エイコペンタエン酸等を含む長鎖多価不飽和酸(LCPUFA)は抗炎症、抗神経変性作用などが報告されている
Leukotriene B4-1	5.85	6.5605	4.75E-05	炎症に関与するロイコトリエン、肥満マウスのインスリン抵抗性を促進
15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin D2	4.29	4.1418	0.005916	内因性 PPAR $\gamma$ アゴニスト。抗炎症作用、インスリン感作作用、抗糖尿病作用を有しており、マウスで神経炎症保護作用、認知症軽減作用が報告された。
13,14-Dihydro-15-keto-prostaglandin D2	3.96	3.6651	0.012432	CRTH2/DP2 受容体に対する選択的なアゴニスト。
Flavanone	4.24	4.0669	0.005916	植物性食品に多く含有されるフラボノイド類の栄養素、抗酸化作用が報告されている。

<引用文献>

1. Joseph Biederman, Carter R Petty, Ronna Fried, Janet Wozniak, Jamie A Micco, Aude Henin, et al. Child behavior checklist clinical scales discriminate referred youth with autism spectrum disorder: a preliminary study. J Dev Behav Pediatr. 2010 Jul-Aug;31(6):485-90.
2. Toshiharu Onodera, Atsunori Fukuhara, Jihoon Shin, Tomonori Hayakawa, Michio Otsuki, Ichiro Shimomura. Eicosapentaenoic acid and 5-HEPE enhance macrophage-mediated Treg induction in mice. Sci Rep. 2017 Jul 4;7(1):4560.
3. Zongyang Li, Yuan Zhang, Yueyang Zheng, Wenlan Liu, Xiejun Zhang, Weiping Li, et al. Intranasal 15d-PGJ2 ameliorates brain glucose hypometabolism via PPAR $\gamma$ -dependent activation of PGC-1 $\alpha$ /GLUT4 signalling in APP/PS1 transgenic mice. Neuropharmacology. 2021 Sep 15;196:108685.

4. Bastihalli T. Diwakar, Ryan Yoast, Shaneice Nettleford, Fenghua Qian, Tai-Jung Lee, Svanjita Berry, et al. Crth2 receptor signaling down-regulates lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B activation in murine macrophages via changes in intracellular calcium. *FASEB J.* 2019 Nov; 33(11): 12838-12852.
5. Florent Vieux, Matthieu Maillot, Colin D Rehm, Adam Drewnowski. Flavonoid Intakes in the US Diet Are Linked to Higher Socioeconomic Status and to Tea Consumption: Analyses of NHANES 2011-16 Data. *J Nutr.* 2020 Aug 1;150(8):2147-2155.
6. M M Wiest, J B German, D J Harvey, S M Watkins, I Hertz-Picciotto. Plasma fatty acid profiles in autism: a case-control study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009 Apr;80(4):221-7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小林澄貴、宮下ちひろ、伊藤佐智子、岸玲子	4. 巻 11
2. 論文標題 DOHaD, ライフコースアプローチによる20年に及ぶ前向き出生コホート研究の成果：環境と子どもの健康に関する北海道スタディ	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 DOHaD研究	6. 最初と最後の頁 63-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.51067/dohad.11.2_63	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学 環境健康科学研究教育センター 研究業績・成果 <a href="https://www.cehs.hokudai.ac.jp/research">https://www.cehs.hokudai.ac.jp/research</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮下 ちひろ  (Miyashita Chihiro)  (70632389)	北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任教授   (10101)	
研究分担者	伊藤 佐智子  (Ito Sachiko)  (90580936)	北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任准教授   (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山口 健史 (Yamaguchi Takeshi)  (80894972)	北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任講師  (10101)	
研究分担者	須山 聡 (Suyama Satoshi)  (70758581)	北海道大学・大学病院・特任助教  (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関